

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-332562

(43) 公開日 平成11年(1999)12月7日

(51) IntCl.⁴

C 1 2 N 15/00
9/50

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00
9/50

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願平11-119317

(22) 出願日 平成11年(1999)4月27日

(31) 優先権主張番号 60/083356

(32) 優先日 1998年4月28日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 594199337

オルソークリニカル ダイアグノスティクス、インコーポレイティド
アメリカ合衆国、ニューヨーク 14650、
ロチェスター、インディゴ クリーク ド
ライブ 100

(72) 発明者 ロバート ティー. ベリー

アメリカ合衆国、ニューヨーク 14580、
ウェブスター、ブルー クリーク ドライ
ブ 736

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織試料およびパラフィン包埋組織から核酸を抽出するための改良方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は組織試料およびパラフィン包埋組織試料からPCR増幅に適する核酸を迅速且つ効率的に抽出する方法を提供する。

【解決手段】 抽出は、緩衝剤、少なくとも1つの非イオン性界面活性剤およびプロテアーゼ酵素を含んで成る組成物を使って、数分以内に達成される。次いでその試料をアルカリ性pHで加熱しそして遠心分離段階の後、上澄液中のDNAを既知の増幅方法、例えばPCRにおいて直接使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 組織試料から核酸を抽出する方法であって、前記試料から前記核酸を遊離させるのに十分な条件下で、前記試料を緩衝剤、少なくとも1つの非イオン性界面活性剤およびプロテアーゼ酵素と接触させ、前記プロテアーゼ酵素を不活性化するのに十分な時間に渡り、アルカリ性pHで前記試料を加熱し、そして前記試料を遠心分離して上澄液中に前記核酸を単離することを含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸の抽出方法およびそのためのキットに関する。特に、本発明は組織試料およびパラフィン包埋組織試料から核酸を抽出する方法に関する。

【0002】生物学的診断の分野では、遺伝病、癌および感染症の検出のために、核酸の増幅を含む分子技術の使用が増加してきている。しかしながら、そのような増幅技術を組織または他の重要な臨床試料に適用する際には、核酸調製物中に不純物が存在すると増幅感度や増幅効率を抑制または低下させることがある〔Wilson, I. G., *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 3741-3751, 1997〕。

【0003】古記録 (archival) のパラフィン包埋病理学組織試料からのDNA抽出は、分子診断測定を患者の結果と関連づけることができる追想的研究において特に有用である。CrisanおよびMattsonにより指摘されたように (DNA and Cell Biology 12:455-464, 1993)、追想的DNA分析の利点は多数あり、そして(i) ウイルス、細菌または原生動物の物質が病因の役割を果たすと疑われ、潜在的な疫学または予後の相関関係が導き出せるようになる、多数の病気経過の研究；(ii) 様々なタイプの悪性に関連する内因性DNA異常の研究；(iii) 遺伝病における遺伝したDNAの研究；(iv) 古記録試料の使用が、新鮮組織を必要とする予想的研究において可能であるよりも大きな患者研究グループを使用できるようにする、珍しい病気の追想的研究；および(v) 臨床結果が既に知られている場合、特定の病気の有無、形態学的診断またはタイプ、病期、予後、および治療に対する応答と相関関係がある可能性の研究、に適用することができる。

【0004】DNAの増幅について報告された方法は、DNAポリメラーゼの使用 (例えばポリメラーゼ連鎖反応、PCR)、リガーゼの使用 (リガーゼ連鎖反応、LCR) または両方の使用 (GAP-LCR) のいずれかに基づいている。それらの方法のうち、PCRが現在まで最も広く使われている。PCRは、適当な条件下でDNA重合剤とデオキシリボヌクレオシド三リン酸の存在下で標的核酸の鎖にプライマーをハイブリダイズせしめることを含んで成る。その結果は、数サイクルの増幅を

通じたプライマー伸長生成物の形成、および元の標的配列の数の指数的增加である。PCRについての更なる詳細は、米国特許第4,683,195号 (Mullis他)、同第4,683,202号 (Mullis) および同第4,965,188号 (Mullis他) 明細書を調べることにより得ることができる。

【0005】固有の感受性のために、一般に試料間の生成物の持ち越しや汚染がPCRおよび核酸増幅方法に伴う問題である。試料調製中の生成物の持ち越しは深刻な問題である。それは試料が外部環境に暴露される時間の量の関数であり、試料収容装置を開放することによって試料を外部環境に暴露しなければならない回数に関係する。よって、迅速であり且つ外部環境への試料の暴露を減少させるかまたは最小にする試料調製方法を提供することが有利である。特に、試料収容装置を開放しなければならない回数が最小である核酸抽出方法を提供することが有利である。

【0006】多数のヒト癌腫においてras プロトオンコジーン中の点変異が高頻度で起こるので、それは潜在的に重要な診断の標的である (Bos, J.L., *Cancer Res.* 49:4682-4689, 1989)。例えば、肺癌の90%位がK-ras遺伝子中に変異を含み、大部分はコドン12において起こる (Almoquera 他, *Cell* 53:549-554, 1998)。ras変異の存在を検出する方法は多数存在する。1つの方法として、制限エンドヌクレアーゼ媒介選択的PCR (REMS-PCR) が最近記載されている (WO 96/32500)。

REMS-PCRはPCR熱循環の間に耐熱性制限酵素を使用することに基づく。REMS-PCRは分析と検出を単純化し且つそれに要する時間を大幅に短縮する。

【0007】Volenandt 他により指摘されたように、抽出されるDNAの量はPCR反応の収率に大きく影響を及ぼし得る (Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA from Paraffin-Embedded Tissue, *Methods in Molecular Biology* Vol. 15: Current Methods and Applications, 1993, B.A. White 編, Humana Press Inc., N.J.)。固定化組織からのDNAを分析する時、添加する抽出試料の容量とPCR増幅収率との間に反比例関係がしばしば観察される。これは、或る種の固定剤およびTaq DNAポリメラーゼ活性に対する他の阻害剤の影響によるものである。更に、固定またはDNA抽出中に起こる核酸の断片化も、DNA増幅の際に問題となり得る (Greer 他, *Am. J. Clin. Pathol.* 95:117-124, 1991; Crisan 他, *Clin. Biochem.* 25:99-103, 1992)。

【0008】パラフィン組織片または新鮮組織片からのDNA抽出の場合、典型的には、複雑なDNA調製方法が用いられる。そのような方法は、DNAを遊離させそして核酸増幅を妨害し得るタンパク質を分解するために、界面活性剤の存在下でプロテアーゼ酵素と共に長時間インキュベートすることを必要とする。抽出されたDNAの精製の際に行われるその後の別段階として、混入

したRNAを除去するためのRNアーゼによる処理に続き、タンパク質や他の細胞性物質を除去するためのエタノールのような溶媒またはフェノールとイソアミルアルコールのような溶媒混合物を使ったDNAの沈澱、次いでDNAの水和を含み得る (Volenandt 他, Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA from Paraffin-Embedded Tissue, Methods in Molecular Biology Vol. 15: Current Methods and Applications, 1993, B.A. White 編, Humana Press Inc., N.J.)。パラフィン包埋組織の場合、普通はプロテイナーゼ段階の前に多段階法においてキシレンのような溶媒を使って抽出することにより、パラフィンが除去される。Banerjee他による最近の報告は、パラフィン包埋組織からのDNA遊離のためのプロトコルを提供している (BioTechniques 18:768-773, 1995)。この方法は次の段階を含む: (1) マイクロウェーブ処理、(2) 遠心分離段階によるパラフィンの除去、(3) プロテイナーゼK消化、および(4) プロテアーゼK活性を失活させるための加熱段階。

【0009】Slebosと彼の仲間、パラフィン包埋組織からDNAを遊離させる方法であって、3つの10ミクロン切片を使用し、非イオン性界面活性剤と共にインキュベートし、そしてプロテイナーゼKと共に18〜24時間インキュベートした後、遠心分離することを含んで成る方法を報告している (Diagnostic Molecular Pathology 1(2); 136-141, 1992)。結果として得られた上澄液はそのままPCR増幅に使われる。

【0010】プロテイナーゼKとの長いインキュベーションの必要性および加熱不活性化段階の必要性を回避するために、ニュージーランド特許NZ 233270 の仮明細書は、細胞タンパク質を消化しそして核酸を遊離させるために、プロテイナーゼKに代わるものとして耐熱性プロテイナーゼの使用を記載している。この方法は速さと使用容易性の改善を提供する。しかしながら、その方法では、パラフィン包埋組織から遊離される増幅可能なDNAの量が限定される。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】従って、その後の増幅方法に適合する方法で、組織試料から迅速且つ高効率に核酸を抽出する方法が当業界でまだ要望されている。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は上述の課題を解決し、且つその後の増幅方法に適合する方法で組織試料から核酸を抽出する方法を提供する。よって、本発明の目的は、組織試料およびパラフィン包埋組織試料から核酸を抽出する方法並びにそのためのキットを提供することである。本発明の他の様々な目的および利点は、発明の詳細な説明から明らかであろう。

【0013】一態様では、本発明は、組織試料から核酸を抽出する方法に関する。この方法は、組織試料から核酸を遊離させるのに十分な条件下で、組織試料を緩衝

剤、少なくとも1つの非イオン性界面活性剤およびプロテアーゼ酵素と接触させることを含んで成る。次いでその試料をプロテアーゼ酵素を不活性化するのに十分な時間に渡りアルカリ性pHで加熱する。前記試料を遠心分離することにより、上澄液中に核酸が単離される。本明細書中に言及される全ての刊行物は参考として本明細書中に組み込まれる。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明は、抽出された核酸が既知技術を使ったその後の増幅および検出に適するように、組織試料から核酸を抽出する方法に関する。本発明を使って、新鮮な組織試料とパラフィン包埋組織試料の両方のヒト組織試料から、核酸 (DNAおよび/またはRNA) を抽出することができる。本発明を使って核酸を抽出することができる組織の例としては、正常のおよび癌性の肺組織、結腸組織、脾臓組織、胸部組織、前立腺組織、血液および他の体液、並びに検出することができる核酸を含む細胞性物質が挙げられるが、それらに限定されない。

【0015】本発明では、着目のDNAを含むと思われる組織試料を、緩衝剤、少なくとも1つの非イオン性界面活性剤およびプロテアーゼ酵素と同時にまたは連続的に接触せしめる。適当な常用の生物学的緩衝剤としては、pHを約4〜約10、好ましくは約7〜約9で維持する1または複数の有機緩衝剤が挙げられる。有用な緩衝剤としては、非限定的に、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、3-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、トリシン、グリシン、トリス (TRIS)、リン酸塩および当業者に容易に明らかな他のものが挙げられる。使用する緩衝剤の量はpKaに依存し、そして所望のpHを維持するのに十分であるものである。

【0016】多数の非イオン性界面活性剤のいずれも本発明に使用できる。本発明において有用な界面活性剤の例としては、非限定的に、ポリオキシエチレンソルビタン誘導体、ポリオキシエチレンエーテル、ポリグリコールエーテル、ペルフルオロアルキルポリオキシエチレン、フッ素化アルキルアルコキシレート、およびフッ素化アルキルエステル化合物が挙げられる。他の有用な界面活性剤の種類および各種の例は、特に界面活性剤の標準参考文献であるMcCutcheon's Emulsifiers and Detergents, 1986 North American Edition, McCutcheon Division Publishing Co., Glen Rock, NJ. を参考にすれば、当業者に容易に明白であろう。典型的な非イオン性界面活性剤は米国特許第5,231,015号 (Cummins 他) 明細書中にも与えられており、その内容が参考として本明細書中に組み込まれる。非イオン性界面活性剤の組合せも本発明に用いることができる。

【0017】プロテアーゼ酵素は組織およびタンパク質を分解して核酸を遊離させるために用いられる。プロテアーゼは遊離したDNAをより安定にするヌクレアーゼ

も分解し得る。好ましくは、プロテアーゼ酵素は耐熱性である。多種多様なプロテアーゼが本発明に使用することができ、その例としてはセリンプロテアーゼ (E.C.3.4.21、例えばトリプシンおよびキモトリプシン)、チオールプロテアーゼ (E.C. 2.4.22、例えばパパイニン、フィシン)、カルボキシプロテアーゼ (酸性プロテアーゼ、E.C. 2.4.23、例えばペプシン)、およびメタロプロテアーゼ (E.C. 2.4.24、例えばサーモリシン、プロナーゼ) が挙げられる。温度、pH、イオン強度、および界面活性剤タイプの最適条件は、使用するプロテアーゼによって異なるだろう。好ましいプロテイナーゼとしては、プロテアーゼ K [E.C. 3.4.21.64、トリチラクウム・アルブム (*Tritirachium album*) から]、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) からのプロテアーゼ (P6911, Sigma Chemical Company, St. Louis) および PRF-TAQ が挙げられる。PRF-TAQ は、Peek, K. 他 (Purification and characterization of thermostable proteinase, Eur. J. Biochem. 207:1035-1044, 1992) により記載されたように、テルムス (*Thermus*) 種 RT41 株から単離された非常に耐熱性のアルカリ性プロテアーゼである。この酵素は 70°C で 24 時間後に全く活性の損失がなく、且つ室温で 6 か月以上も活性の損失がないと報告された非常に耐熱性の酵素である。PRE-TAQ および同様の耐熱性酵素の使用は、75°C 付近およびそれ以上の温度でパラフィンが融解することから、パラフィン組織からの DNA の調製に有利である。よってそのような高度の耐熱性プロテアーゼの使用は、プロテアーゼ消化前にパラフィンを除去するための別個の溶媒抽出プロトコルを行う必要性を除去する。溶媒によるパラフィン除去方法は、上記に引用した Volkenandt 他、Wright & Manos、および Greer による参考文献中に記載されており、それはオクタンまたはキシレンを使った処理に続きエタノールもしくは他のアルコールまたはアセトンのような溶媒を使った処理という多段階処理の使用に基づいている。

【0018】試料は DNA を遊離させるのに十分な条件下で緩衝剤、非イオン性界面活性剤およびプロテアーゼ酵素と接触せしめられる。使用する条件は、使用する組織試料とプロテアーゼによって異なるだろうが、それは当業者により容易に決定することができる。例えば、PRE-TAQ プロテアーゼを使う時、70°C ~ 100 °C において、温度によって 5 分間 ~ 3 時間、試料を緩衝剤、非イオン性界面活性剤およびプロテアーゼと接触させることができる。90°C ~ 100 °C で 10 ~ 15 分間が好ましい。プロテアーゼ K を使う場合、試料を 30 分 ~ 24 時間、緩衝剤、非イオン性界面活性剤およびプロテアーゼと接触させることができる。30 分 ~ 60 分間が好ましい。

【0019】次いでプロテアーゼを不活性化するのに十分な時間に渡りアルカリ性 pH で試料を加熱する。試料の pH は、アルカリ性 pH が得られるまで試料に水酸化

ナトリウムまたは水酸化カリウムを添加することにより調整することができる。次いで抽出された核酸を遠心分離により単離することができる。

【0020】本発明に開示される方法は多数の利点を有する。本発明の方法は迅速であり、潜在的に毒性の溶媒を使用する必要性をなくし、そして試料収容装置を開放しなければならない操作の回数を最小にする。加熱したアルカリでの処理段階を含めることは、多分二本鎖 DNA を変性させそしてそれを PCR で一層容易に増幅できる一本鎖 DNA の小片に変えることにより、PCR 増幅を改善する。熱アルカリでの処理はプロテアーゼを変性させ、そのため残余のプロテアーゼ活性がその後の増幅に必要な Taq ポリメラーゼまたは他の酵素を阻害してしまうかもしれないという心配を取り除くと期待される。第三に、PCR 増幅を阻害することが知られている幾つかの化学物質 (ヘパリン、ヒリルピン、ヘモグロビン等) が熱アルカリ処理により変性されることも期待される。第四に、熱アルカリ処理は、或る PCR 増幅プロトコルを妨害することがある RNA を破壊する。最後に、熱アルカリ処理はまた、脂質、脂肪酸および他の重要な細胞膜の可溶化をもたらすと期待されよう。この細胞膜の完全性の破壊は更に、細胞および組織から遊離される DNA を増加させると期待される。

【0021】本発明に従って組織試料から抽出される核酸は、当該技術分野で既知の方法 (例えば PCR や LCR) を使ったその後の増幅に相当である。PCR を使った核酸の増幅および検出のための一般原理および条件は十分に周知であり、その詳細は多数の刊行物、例えば米国特許第 4,683,195 号 (Mullis 他)、同第 4,683,202 号 (Mullis) および同第 4,965,188 号 (Mullis 他) 明細書に提供されている。それらの刊行物は全て参考として本明細書中に組み込まれる。好ましくは、PCR は耐熱性 DNA ポリメラーゼを使って実施される。多数の適当な耐熱性 DNA ポリメラーゼが当該技術分野において報告されており、例えば米国特許第 4,965,188 号 (Gelfand 他) および同第 4,889,818 号 (Gelfand 他) 明細書中に詳細に記載されている。その両刊行物は参考として本明細書中に組み込まれる。PCR において使用することができる他の試薬としては、例えば、増幅前に耐熱性 DNA ポリメラーゼを抑制する、該 DNA ポリメラーゼに特異的な抗体が挙げられる。そのような抗体は米国特許第 5,338,671 号 (Scalice 他) 明細書 (その内容は参考として本明細書中に組み込まれる) 中に記載されたモノクローナル抗体により代表される。

【0022】増幅された核酸は、多数の既知方法、例えば米国特許第 4,965,188 号 (Gelfand 他) 明細書に記載されたものにより検出することができる。例えば、増幅された核酸はサザンブロット法、ドットブロット技術、または標識プローブによる非同位体オリゴヌクレオチド捕捉検出法を使って検出することができる。あるいは、

適当に標識されたプライマーを使って増幅を実施し、そして前記標識の検出のための手順および装置を使って増幅されたプライマー伸長生成物を検出することができる。よって、当該技術分野の技術と本明細書中に提供される特別な技術を考慮すれば、当業者は、新鮮組織試料またはパラフィン包埋組織試料からその後のPCR増幅および検出に適当な核酸を抽出するために何ら困難なしに本発明を実施できるだろう。

【0023】本明細書中、時間に対して言及する時、「約」という語は、その時間限界値の±10%を指す。温度に対して言及する時、「約」という語は、±5℃を指す。

【0024】次の実施例は本発明の幾つかの態様を例証するために提供されるのであって、本発明を限定するものと解釈してはならない。

【0025】

【実施例】材料および方法：パラフィン包埋組織
パラフィン包埋組織の分析用に、パラフィン塊から10ミクロン片を切り取り、そして1.5 mlの無菌スクリューキ*

表1

K-ras コドン12のためのREMS-PCRプライマー配列

プライマー配列

5BK1T (診断) (ビオチン化)	TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT
3K2 (診断)	CCT CCA CAA AAT GAT TCT GA
5BK5 (PCR対照) (ビオチン化)	TCA GCA AAG ACA AGA CAG CTA
3K6 (PCR対照)	AGC AAT GCC CTC TCA AGA
5BK28 (酵素対照) (ビオチン化)	AGT AAA AGG TGC ACT GTA ATA ATC
3K29 (酵素対照)	GTG TCG AGA ATA TCC AAG AGC CA

【0028】REMS-PCR用の反応混合物は、12単位/100 μLの組換えTaqポリメラーゼ、0.842 μLのTaq阻害抗体TP4-9.2 (5倍過剰)、10 mM HT50緩衝剤 (100 mM NaCl および50 mM Tris-HCl, pH 8.3)、0.3 μMのプライマー 5BK1Tおよび3K2、0.05 μMのプライマー 5BK5、3K6、5BK28 および3K29、0.2 mM全ジヌクレオシド三リン酸 (dNTPs)、0.6 単位/μLのBstn1 (New England BioLabs, Beverly, MA)、1 mMジチオスレイトール (DTT)、4 mM MgCl₂、試料 (典型的には3 μL) 並びに最終容量100 μLまでの脱イオン水を含んだ。典型的には、Taqポリメラーゼと抗Taq抗体を混合し、そして10~15分間インキュベートした後、その他のPCR反応成分を添加した。Bstn1制限酵素は、試料の添加の直前に最後に反応混合物に添加した。

【0029】上記反応混合物を、米国特許第5,089,233号、同第5,229,297号および同第5,380,489号明細書に記載された核酸増幅および検出のためのオルソークリニ

* ヶップ付試験管に入れた。試料間の汚染を防止するために、新たなパラフィン塊毎に新しい刃を使った。各切片を切った後、圧縮空気の噴射により、刃とマイクローム領域を清浄した。新しい木製アプリケーション棒を使って各切片を収容試験管に移した。

【0026】制限エンドヌクレアーゼ媒介選択的PCR (REMS-PCR) 変異分析

REMS-PCRを使ってK-ras 遺伝子のコドン12の1番目と2番目の塩基の変異を検出した。各PCR反応は3セットのプライマーを含んだ (表1)。診断プライマーは野性型ras中にBstn1制限部位を誘導するが、コドン12の変異は誘導しない。よって、ras野性型DNAはPCR熱循環の間に選択的に開裂され、そしてコドン12のところのras変異型配列が富化される。PCR対照プライマーはPCR増幅可能DNAが抽出されることを確かめ、そして酵素対照プライマーは制限酵素が機能していることを確かめるために用いる。

【0027】

【表1】

カルダイアグノスティクス、インコーポレイティドのバウチ収容システムを使って増幅しそして検出した。簡単に言えば、上述した通りに試料とPCR試薬を混合し、バウチの膨れ部分 (プリスター) に充填し、そしてバウチをシールした。ビオチン標識診断プライマー、PCR対照プライマーおよび酵素対照プライマーを増幅に使った。「PCR反応プリスター」を94℃で1分間加熱し、次いで30サイクル増幅させた。各サイクルは、94℃の融解温度および10秒間のインキュベーションに続き、58℃で75秒間のアニーリングを含んだ。103℃で5分間の加熱後インキュベーションの後、反応生成物を検出チャンパーに通過させ、そこで反応生成物がビーズに取り付けた相補的オリゴヌクレオチド (オリゴ体; 表2) とハイブリダイズすることにより、増幅生成物を検出した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 路および洗浄路は55℃であり、一方、検出路では40℃の温度を使った。HRP-ストレプトアビジンおよびその後HRP-色素

基質を検出路に通過させた後、ハイブリダイズした生成物を検出した。 * 【0030】
* 【表2】

表2

捕捉オリゴ体配列

捕捉オリゴ体	配列
Cap-2E	5' GAC TGT GTT TCT CCC TTC TCA GGA TTC C
K-CapD8	5' TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC A
K-Cap6	5' GAC ATA ACA GTT ATG ATT TTG CAG AAA ACA GAT C
INC 26.7	5' TTA GTA GTA GAA GGA CGA CGA TGG CG

【0031】表2の各オリゴヌクレオチドの3' 末端に、ポリスチレンビーズへの付着のために次の配列：5' 57Tを有するリンカーを使用した。ここで塩基#5はテトラエチレングリコール(TEG) スペーサーであり、そして塩基#7はアミノジオールリンカー(ADリンカー)であり、そしてTはチミジン配列である。

【0032】各パウチは3つの検出プリスターを含み、各々が200 μLの液体を有した(ストレプトアビジン-HRP 200μL /プリスター; 洗浄溶液 200μL /プリスター; および色素/ゲル 200μL /プリスター)。プリスターの順序はストレプトアビジンプリスター、次に洗浄溶液プリスター、そして最後に色素/ゲルプリスターであった。

【0033】捕捉オリゴ体ビーズは次の順序でパウチ中に配置された(流れの方向で): INC 26.7a, K-Cap 6 M, 無スポット, K-CapD8, 無スポット, K-Cap2E およびINC26.7a。

【0034】実施例1: Pre-Taq 処理後、NaOHおよび加熱処理の有無のもとでのパラフィン包埋組織からのDNAの抽出

この実施例では、異なる癌試料からの厚さ10ミクロンの

パラフィン切片を次のように抽出した。ミクロトーム切断後、切片試料を1.5 mLのスクリュキャップ付超遠心管に入れた。80μL のT F K緩衝液(10 mM Tris-HCl緩衝液, pH 8.0および0.5 %Tween 20)を添加し、次いで10μLの耐熱性プロテアーゼK (Pre-Taq) (0.3 単位/μL, Gibco/BRL Products, Gaithersburg, MD)を添加した。試験管を100 °Cで5分間加熱した。まだ熱い状態で1セットの複製試験管を14,000 rpmで2分間遠心分離し、そしてパラフィン層の下の上澄液を新しい試験管に移し、分析まで4 °Cで冷蔵保存した。第二セットの複製試験管に、10μLの250mM NaOHを加え、そして試験管をヒートブロック中で105 °Cで3分間加熱した。まだ熱い状態でその試験管を14,000 rpmで2分間遠心分離し、そしてパラフィン層の下の上澄液を取り出し、新しい試験管に移し、分析まで4 °Cで保存した。

【0035】各上澄液の5 μLを1 mLキュベットに添加し、そしてBeckman DU70型分光光度計上で260 nmの吸光度を測定することにより、DNA濃度を決定した。その結果を下の表3に与える。

【0036】

【表3】

表3

Pre-Taq 処理後のパラフィン包埋組織からの
DNA抽出に対する熱NaOHの効果

組織	処理	DNA濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
扁桃癌	NaOH処理有り	0.41
扁桃癌	NaOH処理無し	0.20
結腸直腸癌	NaOH処理有り	0.28
結腸直腸癌	NaOH処理無し	0.15
肺癌	NaOH処理有り	0.52
肺癌	NaOH処理無し	0.25
脾臓	NaOH処理有り	0.50
脾臓	NaOH処理無し	0.35

【0037】ここで調べた組織の各々について、NaOH処理を行った時のパラフィン片からはPre-Taq 処理だけのものと比較して、抽出されたDNA量に約2倍の増加が観察された。

【0038】各上澄液の4 μL を、上述した「パウチアッセイ」におけるREMS-PCRに基づいて、コドン*

*12のK-ras 変異の検出を目的としたPCR増幅にかけた。パウチ法での二重反復アッセイの結果を表4に与える。

【0039】

【表4】

表4

NaOH処理の有無のもとでのPre-Taq で抽出された試料の
K-12 ras変異のREMS-PCR パウチアッセイ

目視評点

試料	NaOH 処理	診断	PCR対照	酵素対照
脾臓	+	(0, 0)	(3, 4)	(2, 2)
	-	(0, 0)	(0, 1)	(0, 1)
結腸直腸	+	(0, 0)	(2, 5, 3, 5)	(3, 3, 5)
	-	(0, 0)	(2, 5, 2, 0)	(3, 5, 2, 5)
肺	+	(0, 0)	(2, 4)	(1, 2, 5)
	-	(0, 0)	(3, 2, 5)	(1, 5, 1, 5)
扁桃	+	(0, 0)	(6, 6)	(0, 0)
	-	(0, 0)	(6, 6)	(0, 0)

【0040】上記結果は、NaOH処理した脾臓組織切片からのDNA抽出についてのK-12 ras診断用目視評点が、NaOH処理しない対照と比較して、有意な増加を示す。NaOH処理した直腸結腸癌および肺癌切片においても、対照と比較して、わずかではあるが検出可能な評点の改善を示した。扁桃癌試料はNaOH処理をしてもしなくても強力な増幅（目視評点が6）を示した。

【0041】実施例2：プロテアーゼKでの処理後、NaOH処理したまたは処理しないパラフィン包埋組織からのDNAの抽出

この実験では、次のようにして4つの異なるパラフィン包埋結腸直腸片を処理した：マイクロブチ断後、各切

片を1.5 mLのスクリーキャップ付遠心管に入れた。87 μL のTE K緩衝液を添加し、次いで3 μL の耐熱性プロテアーゼK (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN) を添加した。試験管をヒートブロック中で65°Cで4時間インキュベートした。1セットの複製試験管を100°Cで5分間ヒートブロック中に置き、そしてまだ熱い状態で14,000 rpmで2分間遠心分離し、そしてパラフィン層の下の上澄液を新しい試験管に移し、分析まで4°Cで保存した。第二セットの複製試験管に、10 μL の250 mM NaOHを加え、そして試験管をヒートブロック中で105°Cで3分間加熱した。まだ熱い状態でその試験管を14,000 rpmで2分間遠心分離し、そしてパラフィン層の下の

上澄液を取り出し、新しい試験管に移し、分析まで4℃で保存した。

*【0044】
【表6】

【0042】上述したのと同様に分光光度測定した時、プロテアーゼK処理細胞を使った実験の結果は、対照と比較して、NaOHで処理した試料において抽出されるDNAがわずかにしか増加しなかったことを示す。しかしながら、表6に示されるように、NaOHで処理した試料ではPCR対照プライマーを用いた増幅は強力であり、そしてNaOH処理段階を省略するとPCR対照プライマーによる増幅は全く検出されなかった。

10

【0043】

【表5】

表5

プロテアーゼK処理後の結腸直腸癌パラフィン組織からの
DNA抽出に対する熱NaOHの効果

試料	処理	DNA濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	
1	+NaOH	1.2, 1.2	20
	-NaOH	1.1, 1.1	
2	+NaOH	1.3, 1.3	*
	-NaOH	1.2, 1.2	

表6

NaOH処理の有無のもとでのプロテアーゼKで抽出した試料の
K-12 ras変異のREMS-PCR パウチ分析

目視評点				
試料	処理	PCR対照	診断	酵素対照
1	+NaOH	4.6	0.0	0.0
	-NaOH	0.0	0.0	0.0
2	+NaOH	7.7	7.6	0.0
	-NaOH	0.0	0.0	0.0

フロントページの続き

(72)発明者 ゲイリー ジェイ. チルソン
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14058,
エルバ, ログ シティー ロード 6584,
ポスト オフィス ボックス

【外国語明細書】

1. Title of Invention

Improved Methods for Extracting Nucleic Acids from Tissue Samples
and Paraffin-Embedded Tissues

2. Claims

1. A method of extracting nucleic acids from tissue samples comprising contacting said sample with a buffer, at least one nonionic surfactant, and a protease enzyme under conditions sufficient to releases said nucleic acids from said sample;

heating said sample at an alkaline pH for a period of time sufficient to inactivate said protease enzyme; and

centrifuging said sample to isolate said nucleic acids in supernatant.

3. Detailed Description of Invention

[Technical Filed to Which the Invention Pertains]

The present invention relates to methods and kits for the extraction of nucleic acids. In particular, the present invention relates to methods for extracting nucleic acids from tissue samples and paraffin-embedded tissue samples.

[Prior Art]

Within the field of biological diagnostics, molecular-based techniques involving the amplification of nucleic acids are being used increasingly for the detection of inherited diseases, cancer, and infectious diseases. However, in applying such amplification techniques with tissues or other important clinical samples, impurities in nucleic acid preparations can

inhibit or reduce the sensitivity and efficiency of amplification [Wilson, I.G., Applied and Environmental Microbiology 63(10):3741-3751, 1997).

DNA extraction from archival paraffin-embedded pathology tissue samples is particularly useful in retrospective studies in which the determination of a molecular diagnosis can be correlated with patient outcome. As pointed out by Crisen and Mattson (DNA and Cell Biology 12:455-464, 1993), the advantages of retrospective DNA analysis are multiple and can be applied to: (i) the study of numerous disease processes, where viral, bacterial, or parasitic agents are suspected to play an etiologic role becomes possible and epidemiological or prognostic correlation may be derived; (ii) the study of endogenous DNA abnormalities associated with various types of malignancies; (iii) the study of inherited DNA in genetic diseases; (iv) retrospective studies of rare diseases for which use of archival specimens would allow larger patient study groups than would be possible in prospective studies requiring fresh tissues; and (v) the possibility of correlating the presence or absence of a particular disease, morphological diagnosis or type, disease stage, prognosis, and response to treatment, where the clinical outcome is already known.

Methods reported for the amplification of DNA are based either on the use of a DNA polymerase (e.g., polymerase chain reaction, PCR), a ligase (ligase chain reaction, LCR), or both (GAP-LCR). Of these methods, PCR has been the most widely used to date. PCR involves the hybridization of primers to the strands of a target nucleic acid in the presence of a DNA polymerization agent and deoxyribonucleoside triphosphates under appropriate conditions. The result is the formation of primer extension products throughout several cycles of

amplification, and exponential multiplication of the number of original target sequences. Further details about PCR can be obtained by consulting US-A-4,683,195 (Mullis, et al), US-A-4,683,202 (Mullis), and US-A-4,965,188 (Mullis et al).

Because of its inherent sensitivity, product carryover and contamination between samples is a problem with PCR and nucleic acid based amplification systems in general. Product carryover during sample preparation is a serious problem. It is a function of the amount of time that a sample is exposed to the external environment, and related to the number of times the sample containment device must be opened, thereby exposing the sample to the external environment. Thus, it is advantageous to have a sample preparation method that is rapid and allows reduced or minimal exposure of the sample to the external environment; particularly, it is an advantage to provide a method of nucleic acid extraction where the number of times the sample containment device has to be opened is minimal.

Point mutations in the ras proto-oncogenes occur with great frequency in many human cancers, and are a potentially important diagnostic target (Bos, J.L., Cancer Res. 49:4682-4689, 1989). For example, as much as 90% of pancreatic cancer involves a mutation in the K-ras gene; the majority occurring in codon 12 (Almoguera et al., Cell 53:549-554, 1998). There are a number of methods for detecting the presence of a ras mutation. One method, restriction endonuclease mediated selective-PCR (REMS-PCR) has been described recently (WO 9632500). REMS-PCR is based upon the use of a thermostable restriction enzyme during PCR thermocycling. REMS-PCR greatly simplifies and decreases the time required for analysis and detection.

As pointed out by Volenandt et al., the amount of extracted DNA can dramatically affect the yield in a PCR reaction (Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA from Paraffin-Embedded Tissue. Methods in Molecular Biology Vol. 15: Current Methods and Applications, 1993, edited by: B.A. White, Humana Press Inc., NJ.) When analyzing DNA from fixed tissue, an inverse relationship between the volume of extracted sample added and PCR amplification yield often is observed. This is due to the effects of certain fixatives and other inhibitors on Taq DNA polymerase activity. Furthermore, nucleic acid fragmentation occurring during fixation or DNA extraction also can be a problem in amplification of DNA (Greer et al., Am. J. Clin. Pathol. 95:117-124, 1991; and Crisan et al., Clin. Biochem. 25:99-103, 1992).

In the case of DNA extraction from paraffin or fresh tissue sections, complex methods for DNA preparation are typically used. Such methods require long incubations with protease enzymes in the presence of surfactants to release DNA and to degrade proteins that can interfere in nucleic acid amplification. Other subsequent steps in purification of extracted DNA may include treatment with an RNAase to remove contaminating RNA, followed by DNA precipitation with a solvent such as ethanol or a mixture of solvents such as phenol and isoamyl alcohol to remove protein and other cellular material, followed by DNA hydration (Volenandt et al., Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA from Paraffin-Embedded Tissue. Methods in Molecular Biology Vol. 15: Current Methods and Applications, 1993, edited by: B.A. White, Humana Press Inc., NJ.). In the case of paraffin-embedded tissues, paraffin is usually removed by extraction with solvents such as xylene in a multiple step procedure prior to the proteinase step. A recent report by Banerjee et al.

provides a protocol for DNA release from paraffin-embedded tissues (BioTechniques 18:768-773, 1995). The method involves the following steps: (1) microwave treatment, (2) removal of the paraffin by a centrifugation step, (3) Proteinase K digestion, and (4) a heat step to destroy Protease K activity.

Slebos and his associates have reported a method for releasing DNA from paraffin-embedded tissue which includes the use of three 10 micron sections, an incubation with a non-ionic detergent, and an 18-24 hr incubation with Proteinase K, followed by centrifugation (Diagnostic Molecular Pathology 1(2):136-141, 1992). The resultant supernatant is used directly in PCR amplification.

To overcome the need for long incubation with Proteinase K and the need for a heat inactivation step, the provisional specification of NZ 233270 describes the use of a thermostable proteinase instead of Proteinase K for digestion of cell protein and release of nucleic acid. This method provides an improvement in speed and ease-of-use. However, it is limited by the amount of amplifiable DNA that is released from paraffin-embedded tissue.

[Problems to Be Solved by the Invention]

Thus, there is still a need in the art for a rapid and highly effective means of extracting nucleic acids from tissue samples in a manner that is compatible with subsequent amplification procedures.

[Means to Solve the Problems]

The present invention overcomes the above-noted problems and provides a needed means of extracting nucleic acids from tissue samples in a manner compatible with subsequent amplification methods. Thus, it is an object of the present invention to provide methods and kits for extracting nucleic acids from tissue samples and paraffin-embedded tissue samples.

Various other objects and advantages of the present invention will be apparent from the detailed description of the invention.

In one embodiment, the present invention relates to a method of extracting nucleic acids from tissue samples. The method comprises contacting the tissue sample with a buffer, at least one nonionic surfactant, and a protease enzyme under conditions sufficient to release the nucleic acids from the sample. The sample is then heated at an alkaline pH for a period of time sufficient to inactivate the protease enzyme. By centrifuging the sample, the nucleic acids are isolated in the supernatant.

All publications mentioned herein are hereby incorporated by reference.

[Mode for Carrying out the Invention]

The present invention relates to methods for extracting nucleic acids from tissue samples so that the extracted nucleic acids are suitable for subsequent amplification and detection using known techniques. Using the present invention, nucleic acids (DNA and/or RNA) can be extracted from human tissue samples, both fresh tissue samples and paraffin-embedded tissue samples. Examples of tissues from which nucleic acids can be extracted using the present invention include, but are not limited to, both normal and cancerous lung tissue, colon tissue, pancreatic tissue, breast tissue, prostate tissue, blood and other body fluids or cellular material containing nucleic acids that can be detected.

In the present invention, tissue samples suspected of containing DNA of interest are contacted with a buffer, at least one nonionic surfactant, and a protease enzyme, sequentially or simultaneously. Suitable common biological buffers include one or more organic buffers that maintain the pH at from about 4 to about 10, and preferably at from about 7 to about 9. Useful buffers include, but are not limited to, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, 3-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, tricine, glycine, TRIS, phosphate, and others readily apparent to those skilled in the art. The amount of buffer used is dependent upon the pKa and is that sufficient to maintain the desired pH.

Any of number of nonionic surfactants can be utilized in the present invention. Examples of surfactants useful in the present invention include, but are not limited to, polyoxyethylenesorbitan derivatives, polyoxyethylene ethers, polyglycol ethers, perfluoroalkyl polyoxyethylenes, fluorinated alkyl alkoxylates and

fluorinated alkyl ester compounds. Other useful classes of surfactants and examples of each class would be readily apparent to one skilled in the art, especially after consulting the standard reference for surfactants, McCutcheon's Emulsifiers and Detergents, 1986 North American Edition, McCutcheon Division Publishing Co., Glen Rock, NJ. Representative nonionic surfactants are also provided in U.S. Patent No. 5,231,015 (Cummins et al.), the contents of which are hereby incorporated by reference. Combinations of nonionic surfactants can also be used in the present invention.

Protease enzyme is used to break down tissues and protein helping to release the nucleic acids. The protease may also degrade nucleases making the released DNA more stable. Preferably, the protease enzyme is thermostable. A wide variety of proteases can be used in the present invention including serine proteases (E. C. 3.4.21, e.g. Trypsin, and chymotrypsin), Thiol proteases (E. C. 2.4.22, e.g., papain, ficin), carboxy (acid proteases, E. C. 2.4.23, e.g., pepsin), and metalloproteases (E. C. 2.4.24, e.g., thermolysin, pronase). Optimum conditions of temperature, pH, ionic strength, and surfactant type may differ depending upon the protease used. Preferred proteinases include Protease K (E. C. 3.4.21.64 from Tritirachium album), protease from Streptomyces griseus (P6911, Sigma Chemical Company, St. Louis), and PRETAQ. PRETAQ is a very thermostable alkaline protease isolated from Thermus sp. Strain RT41 as described by Peek, K., et al. (Purification and characterization of a thermostable proteinase, Eur. J. Biochem 207:1035-1044, 1992). The enzyme is extremely thermostable with no loss of activity reported after 24 hr at 70°C, and no loss of activity at room temperature over 6 months. The use of PRETAQ and similar thermostable enzymes have advantages in the

preparation of DNA from paraffin tissues since paraffin melts at temperatures around 75°C and above. Thus, the use of such highly thermal stable proteases eliminates the need for separate solvent based extraction protocols for paraffin removal prior to protease digestion. Solvent based de-paraffinization procedures are described in references by Volkenandt et al, Wright and Manos, and Greer, as cited previously, and are based on the use of multiple step treatments with octane or xylene followed by treatment with ethanol or other alcohols, or solvents such as acetone.

The sample is contacted with the buffer, nonionic surfactant and protease enzyme under conditions sufficient to release the DNA. The conditions employed will vary depending on the tissue sample and the protease used but are readily determinable by those skilled in the art. For example, when using PRETAQ protease, the sample can be contacted with the buffer, nonionic surfactant and protease at 70°C to 100°C for 5 minutes to 3 hours depending upon the temperature. At 90°C to 100°C, 10-15 minutes is preferred. If Protease K is utilized, the sample can be contacted with the buffer, nonionic surfactant and protease for 30 minutes to 24 hours. Preferably, for 30 minutes to 60 minutes.

The sample is then heated at an alkaline pH for a period of time sufficient to inactivate the protease. The pH of the sample can be adjusted by adding sodium hydroxide or potassium hydroxide to the sample until an alkaline pH is achieved. The extracted nucleic acids can then be isolated by centrifugation.

The method disclosed in the present invention has many advantages. The method is rapid, eliminates the need for potentially toxic solvents, and minimizes the number of manipulations in which the sample containment

device has to be opened. The inclusion of a treatment step with heated alkali improves PCR amplification, probably by denaturing the double stranded DNA and converting it into smaller pieces of single-stranded DNA which are more readily amplifiable in PCR. Treatment with hot alkali also is expected to denature the protease, eliminating the concern that residual protease activity would inhibit TAQ polymerase or other enzymes required for subsequent amplification. Thirdly, it is also expected that several chemical agents (heparin, bilirubin, hemoglobin etc.) known to inhibit PCR amplification are denatured by hot alkali treatment. Fourthly, hot alkali treatment destroys RNA which may be an interferent in some amplification protocols. Finally, hot alkali treatment also would be expected to result in solubilization of lipids, fatty acids and other crucial cell membrane. This disruption of the integrity of the cell membrane also would be expected to increase DNA released from cells and tissues.

Nucleic acids extracted from tissue samples according to the present invention are suitable for subsequent amplification using known methods in the art such as PCR and LCR. The general principles and conditions for amplification and detection of nucleic acids using PCR are quite well known, the details of which are provided in numerous references, including U.S. Patent Nos. 4,683,195 (Mullis et al.), 4,683,202 (Mullis), and 4,965,188 (Mullis et al.), all of which are incorporated herein by reference. Preferably, PCR is carried out using a thermostable DNA polymerase. A number of suitable thermostable DNA polymerases have been reported in the art, including those mentioned in detail in U.S. Patent Nos. 4,965,188 (Gelfand et al.) and 4,889,818 (Gelfand et al.), both incorporated herein by reference. Other reagents that can be used in PCR

include, for example, antibodies specific for the thermostable DNA polymerase, which inhibit the polymerase prior to amplification. Such antibodies are represented by the monoclonal antibodies described in U.S. Patent No. 5,338,671 (Scalice et al.), the contents of which are hereby incorporated by reference.

Amplified nucleic acids can be detected in a number of known ways, such as those described in U.S. Patent No. 4,965,188 (Gelfand et al.). For example, the amplified nucleic acids can be detected using Southern blotting, dot blot techniques, or nonisotopic oligonucleotide capture detection with a labeled probe. Alternatively, amplification can be carried out using primers that are appropriately labeled, and the amplified primer extension products can be detected using procedures and equipment for detection of the label. Thus, in view of the teachings in the art and the specific teachings provided herein, a worker skilled in the art should have no difficulty in practicing the present invention to extract nucleic acids from fresh tissue or paraffin-embedded tissue samples, which are suitable for subsequent PCR amplification and detection.

As used herein, when in reference to time the term "about" refers to $\pm 10\%$ of that time limit. When used in reference to temperatures, the term "about" refers to $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

The following Examples are provided to illustrate certain embodiments of the present invention, and are not to be construed as limiting the invention.

[Examples]

Material and Methods:

Paraffin-embedded tissues

For the analysis of paraffin-embedded tissues, a 10-micron section was cut from a paraffin block, and placed in a sterilized 1.5 mL screw cap tube. To prevent contamination between samples, a new blade was used with each new paraffin block. The blade and microtome area were cleaned with a jet of compressed air after each section was cut. A fresh wooden applicator stick was used to transfer each section into its containment tube.

Restriction endonuclease mediated selective PCR (REMS-PCR) mutational analysis

Mutations at the first and second bases of codon 12 of the K-ras gene were detected using REMS-PCR. Each PCR reaction contained three sets of primers (Table 1). The diagnostic primers induce a Bstn-1 restriction site in the wild-type ras, but not in a mutation at codon 12. Thus, ras wild-type DNA is selectively cleaved during PCR thermocycling, and mutant sequences of ras at codon 12 are enriched. The PCR control primers verify that PCR amplifiable DNA is extracted, and the enzyme control primers verify that the restriction enzyme is functioning.

Table 1

REMS-PCR Primer Sequences for K-ras codon 12

<u>Primer</u> <u>Sequence</u>	
5BKIT (Diagnostic) (biotinylated)	TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT
3K2 (Diagnostic)	CGT CCA CAA AAT GAT TCT GA
5BK5 (PCR control) (biotinylated)	TCA GCA AAG ACA AGA CAG CTA
3K6 (PCR control)	AGC AAT GCC CTC TCA AGA
5BK28 (Enzyme control) (biotinylated)	AGT AAA AGG TGC ACT GTA ATA ATC
3K29 (Enzyme control)	GTG TCG AGA ATA TCC AAG AGC CA

For REMS-PCR, reaction mixtures contained 12 units/100 μ L of recombinant Taq polymerase, 0.842 μ L of Taq inhibiting antibody TP4-9.2 (a 5 fold excess), 10 mM HT50 buffer (100 mM NaCl, and 50 mM Tris.HCl, pH 8.3), 0.3 μ M of primer 5BKIT and 3K2, and 0.05 μ M of primers 5BK5, 3K6, 5BK28, and 3K29, 0.2 mM total dinucleoside triphosphates (dNTPs), 0.6 units/ μ L of Bstnl (New England BioLabs, Beverly MA), 1 mM dithiothreitol (DTT), 4 mM MgCl₂, sample (typically 3 μ L) and deionized water up to a final volume of 100 μ L. Typically, the Taq and anti-Taq antibodies were mixed and incubated for 10-15 minutes prior to the addition of the other PCR reaction components. Bstnl restriction enzyme was added last to the reaction mix just before the addition of sample.

The above reaction mixture was amplified and detected using an Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. pouch containment system for nucleic acid amplification and detection as described in US 5,089,233, US 5,229,297, and US 5,380,489. Briefly, sample plus PCR reagents, as described above, were mixed and loaded into a blister of

the pouch, and the pouch was sealed. Biotin-labeled diagnostic, PCR control, and enzyme control primers were used in amplification. The "PCR Reaction Blister" was heated at 94°C for 1 min, followed by 30 amplification cycles, each cycle having a melt temperature of 94°C and a 10 second incubation, followed by annealing for 75 seconds at 58°C. After a postheat incubation for 5 min at 103°C, the amplified product was detected after the reaction products were forced through a detection chamber where they hybridized with complementary oligos attached to beads (Table 2). The horseradish peroxidase (HRP) channel, and the wash channel were at 55°C, whereas, a temperature of 40°C was used in the detection channel. The hybridized product was detected after HRP-streptavidin and subsequently the HRP-dye substrate was forced through the detection chamber.

Table 2
Capture Oligo Sequences

<u>Capture Oligo</u>	<u>Sequence</u>
Cap-2E	5' GAC TGT GTT TCT CCC TTC TCA GGA TTC C
K-CapD8	5' TAT CGT CAA GGC ACT CTT GCC TAC GCC A
K-Cap6 GAT C	5' GAC ATA ACA GTT ATG ATT TTG CAG AAA ACA
INC 26.7	5' TTA GTA GTA GAA GGA CGA CGA TGG CG

At the 3' end of each oligonucleotide in Table 2, a linker of the following sequence was used for attachment to polystyrene beads, 557T, where base #5 is a tetraethylene glycol (TEG) spacer and Base #7 is an

Aminodiol linker (AD linker), and T is a thymidine sequence.

Each pouch contained 3 detection blisters, each with 200 μ L of fluid (streptavidin HRP 200 μ L/blister; wash 200 μ L/blister; and dye/gel 200 μ L/blister). The order of blisters was Streptavidin, followed by a wash, and finally a dye/gel blister.

Capture oligo beads were ordered in the pouch (in the direction of flow) as follows: INC 26.7a, K-Cap 6M, No spot, K-capDB, No Spot, K-Cap2E, and INC26.7a.

Example 1 : The extraction of DNA from paraffin-embedded tissue in the presence and absence of treatment with NaOH and heat, after Pre-Taq treatment.

In this example, 10 micron thick paraffin sections from different cancer samples were extracted as follows: after microtome sectioning, the sectioned sample was placed in a 1.5 mL screw-top microcentrifuge tube. Eighty microliters of TEK buffer (10 mM Tris.HCl buffer, pH 8.0, and 0.5% Tween 20) were added followed by 10 μ L of thermostable protease K (Pre-Taq) (0.3 u/ μ L, Gibco/BRL Products, Gaithersburg, MD). The tubes were heated at 100°C for 5 min. One set of duplicate tubes was centrifuged while still hot at 14,000 rpm for 2 min, and the supernatant fluid under the paraffin layer was transferred to a new tube and stored refrigerated at 4°C prior to analysis. To the second set of duplicate tubes, 10 μ L of 250 mM NaOH was added, and the tubes were heated at 105°C for 3 min in a heat block. While hot, the tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 2 min, and the supernatant fluid under the paraffin layer was removed.

and transferred to a new tube, and stored at 4°C prior to analysis.

Five microliters of each supernatant were added to a 1 mL cuvette, and DNA concentration was determined on a Beckman model DU70 spectrophotometer by the absorption at 260 nm. The results are provided in Table 3 below.

Table 3
Effect of Hot NaOH on DNA extraction from Paraffin-
Embedded Tissues after Pre-Taq Treatment

Tissue ($\mu\text{g/mL}$)	Treatment	DNA Concentration
Tonsil	With NaOH	0.41
Tonsil	No NaOH	0.20
Colorectal Cancer	With NaOH	0.28
Colorectal Cancer	Without NaOH	0.15
Lung Cancer	With NaOH	0.52
Lung Cancer	Without NaOH	0.25
Pancreatic Cancer	With NaOH	0.50
Pancreatic Cancer	Without NaOH	0.35

These studies indicated that for each of the tissues examined there was approximately a 2-fold increase in DNA extracted from the paraffin section when NaOH treatment was used compared with a Pre-TAQ treatment alone.

Four microliters of each supernatant was subjected to PCR amplification for detection of the K-ras mutation of codon 12 based on REMS-PCR in a "pouch assay" as

described above. Results of duplicate assays in the pouch system are presented below in Table 4.

Table 4
REMS-PCR Pouch analysis of K-12 ras mutations of samples
extracted with Pre-Taq in the with and without NaOH
treatment

<u>Sample</u>	<u>NaOH</u> <u>Diagnostic</u>	<u>Visual Score</u>	
		<u>PCR control</u>	<u>Enzyme Control</u>
Pancreatic	+	(3,4)	(2,2)
	(0,0)		
	-	(0,1)	(0,1)
	(0,0)		
Colorectal	+	(2.5,3.5)	(3,3.5)
	(0,0)		
	-	(2.5,2.0)	(3.5,2.5)
	(0,0)		
Lung	+	(2,4)	(1,2.5)
	(0,0)		
	-	(3,2.5)	(1.5,1.5)
	(0,0)		
Tonsil	+	(6,6)	(0,0)
	(0,0)		
	-	(6,6)	(0,0)
	(0,0)		

The results indicate a significant increase in the K-12 ras diagnostic visual scores for extraction of DNA from pancreatic tissue sections with NaOH treatment, as compared to a control without NaOH treatment. Detectable, although slight, improvements in detection were also observed in the colorectal and lung cancer sections treated with NaOH, as compared to controls. Tonsil sections showed strong amplification (visual score of 6) with or without NaOH treatment.

Example 2 : The extraction of DNA from paraffin-embedded tissues with and without NaOH treatment, after treatment with Protease-K

In this experiment, four different paraffin-embedded colorectal sections were treated as follows: After microtome sectioning, each section was placed in a 1.5 mL screw-top microfuge tube. Eighty-seven microliters of TEK buffer were added followed by 3 μ L of thermostable Protease K (Gentra Systems, Inc. Minneapolis, MN). The tubes were incubated at 65°C for 4 hrs in a heat block. One set of duplicate tubes was placed in a heat block at 100°C for 5 min, and centrifuged while still hot at 14,000 rpm for 2 min, and the supernatant fluid under the paraffin layer was transferred to a new tube and stored at 4°C prior to analysis. To a second set of duplicate tubes, 10 μ L of 250 mM NaOH was added and the tubes were heated at 105°C for 3 min in a heat block. While hot, the tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 2 min, and the supernatant fluid under the paraffin layer was removed and transferred to a new tube, and stored at 4°C prior to analysis.

Results of these studies with Protease K treated cells indicate only a slight increase in extracted DNA, determined spectrophotometrically as described above, in samples treated with NaOH as compared to controls (Table 5). However, as shown in Table 6, there was strong amplification with the PCR control primers in samples treated with NaOH and no detectable amplification with the PCR control primers when the NaOH step was omitted.

Table 5
Effect of Hot NaOH on DNA extraction from Colorectal
Cancer Paraffin Tissues after Protease K Treatment

Sample ($\mu\text{g/mL}$)	Treatment	DNA Concentration
1	+ NaOH	1.2, 1.2
	- NaOH	1.1, 1.1
2	+ NaOH	1.3, 1.3
	- NaOH	1.2, 1.2

Table 6
REMS-PCR Pouch analysis of K-12 ras mutations of samples
extracted with Protease-K with and without NaOH treatment

Sample	Treatment	PCR control	Visual Score	
			Diagnostic	
	Enzyme Control			
1	+ NaOH	4, 6	0, 0	0, 0
	- NaOH	0, 0	0, 0	0, 0
2	+ NaOH	7, 7	7, 6	0, 0
	- NaOH	0, 0	0, 0	0, 0

1. Abstract

The present invention provides rapid and highly effective methods for extracting nucleic acids suitable for PCR amplification from tissue samples and paraffin-embedded tissue samples. Extraction is accomplished within a few minutes using a composition comprising a buffer, at least one nonionic surfactant, and a protease enzyme. The sample is then heated at alkaline pH and after a centrifugation step, the DNA in the supernatant can be used directly in known amplification methods, such as PCR.

2. Representative Drawings

None